4.ročník – Genetika

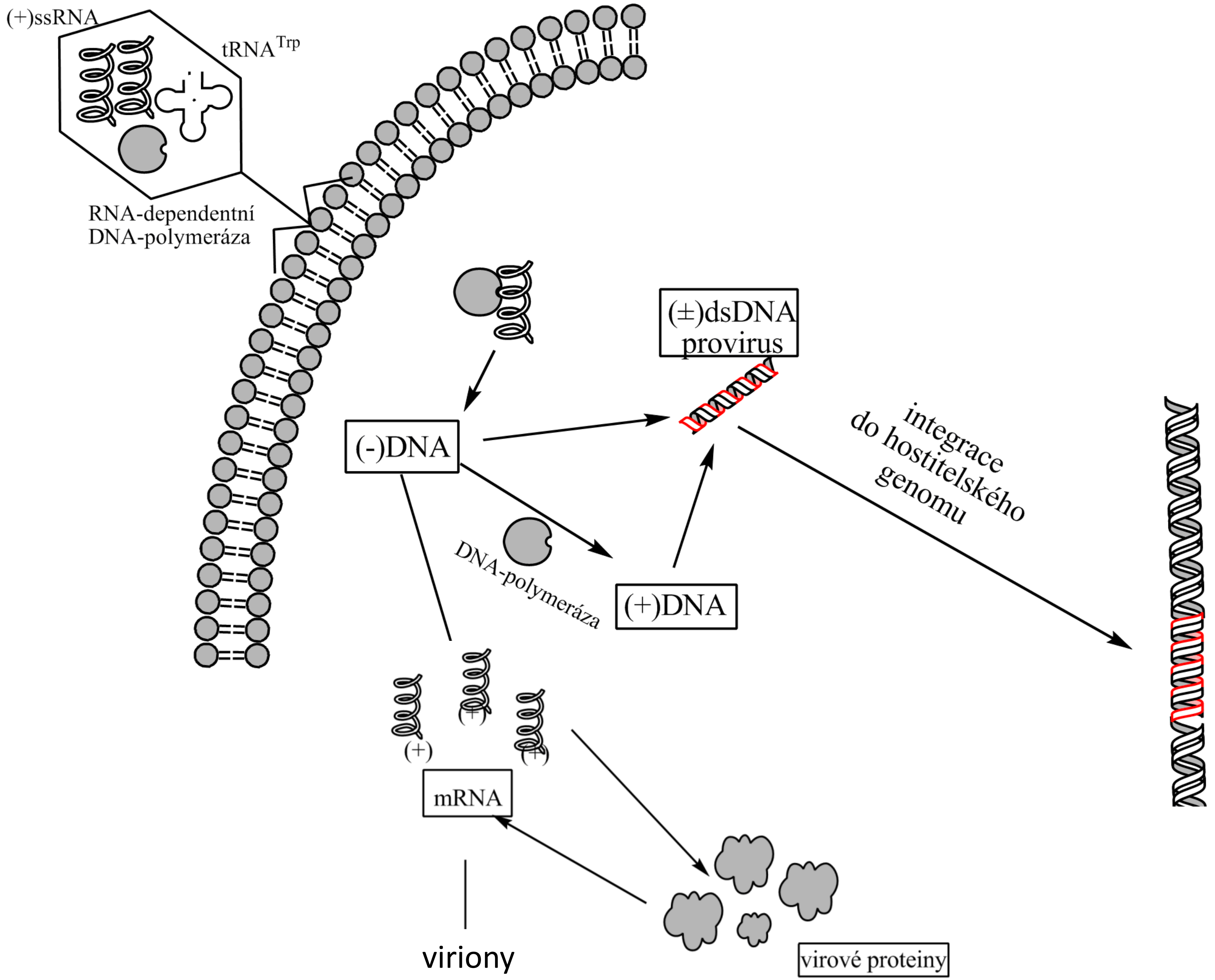
Viry, genové inženýrství
a genová terapie
(9)

Rozmnožování virů:

viry používají transkripční a translační systém hostitelské buňky

(viry nemají ribozomy)

1) vazba viru na povrch hostitele – receptory vysoce specifické
2) vstup do hostitelské buňky
   a) fágy – rozruší povrch hostitele a obsah pronikne dovnitř
   b) celý virus vstoupí do hostitele – endocytózou (obalen plazmatickou membránou hostitele)
3) uvolnění NK z virového obalu
4) replikace NK a syntéza proteinů – podle typu NK
5) obalení nových virových NK kapsomerami a transport k povrchu buňky
6) uvolnění virionů z buňky
   a) exocytózou = pučením – obalením plazmatickou membránou buňky (nelze u buněčné stěny)
   b) rozpadem buňky – lýzou(enzymatickým narušením obalů buňky) = lytický cyklus


(+)ssRNA
tRNA^{Trp}
RNA-dependentní
DNA-polymeráza
(±)dsDNA
provirus
(-)DNA
integrace
do hostitelského
genomu
DNA-polymeráza
(+)DNA
(+)
(+)
(+)
mRNA
virové proteiny
viriony

Viry využívají své hostitele většinou dlouhodobě

1) **Lytický cyklus** – rozpad buňky po namnožení virionů a jejich obalení kapsidou – není strategicky nejvýhodnější
2) **Lyzogenní cyklus** – virová DNA se stává součástí DNA hostitele = **provirus,** hostitelská buňka se množí i s provirovou částí DNA – možnost rekombinace virové DNA. Po čase se virová DNA vyčlení a vzniká virová NK, tvoří se kapsomery a vznikají nové viry – buňka se rozpadá

VIRY – biologické mutageny = začlenění virové DNA do genomu buňky

a) přerušení původního genu (změna sekvencí)
b) virový genom může obsahovat onkogen – tvorba bílkovin stimulujících dělení

   HTLV-1, HTLV-2....způsobují leukémii

- schopnost vložit DNA do hostitelské buňky mají některé bakteriofágy – využito v genovém inženýrství

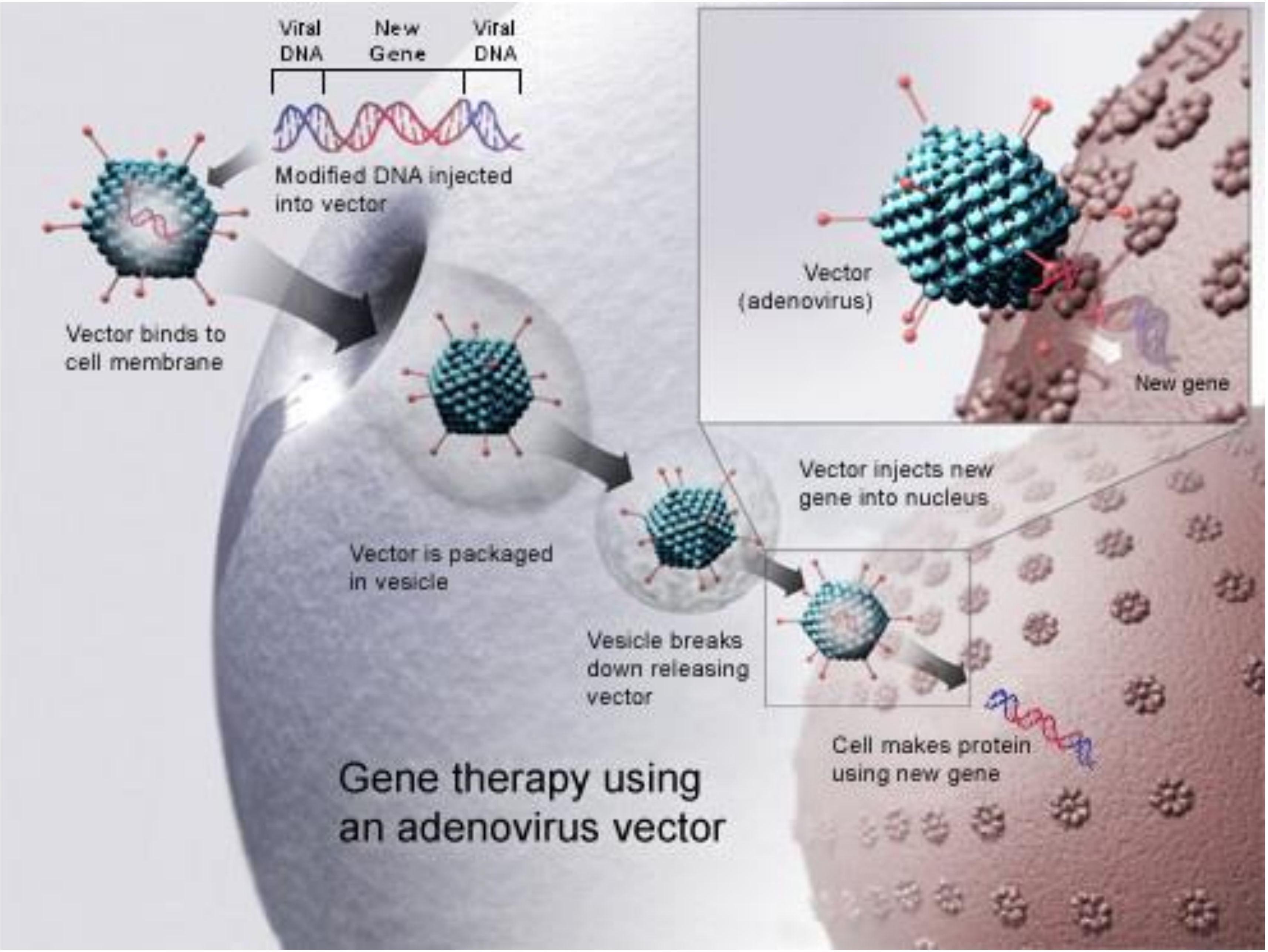
GENOVÁ TERAPIE = viry přenášejí funkční gen do buňky pacienta (retroviry, adenoviry)

Poprvé v roce 1990 – těžká imunodeficience pacientky

a) **in vivo** = přímo do těla(do orgánu) vpraven virus
   - retroviry – působí pouze na dceřinné buňky
   - adenoviry – rychlejší účinek, ale krátkodobý, navíc s reakcí těla na vlastní adenovirus
b) **in vitro** = odběr buněk z těla, vpravení viru a vpravení buněk zpět do těla (kostní dřeň)

Nedostatky genové terapie:

- ✓ možnost poškození genomu pacienta – nelze včlenit přesně
- ✓ polygenní charakter onemocnění = mnoho genů na různých chromozomech se účastní tvorby znaku (nutnost opravy více genů současně!)
- ✓ omezená životaschopnost cílových buněk


Viral DNA
New Gene
Viral DNA
Modified DNA injected into vector
Vector binds to cell membrane
Vector (adenovirus)
New gene
Vector is packaged in vesicle
Vector injects new gene into nucleus
Vesicle breaks down releasing vector
Cell makes protein using new gene
Gene therapy using an adenovirus vector

Základní principy

Reverzní transkriptáza (ze skupiny DNA polymeráz)

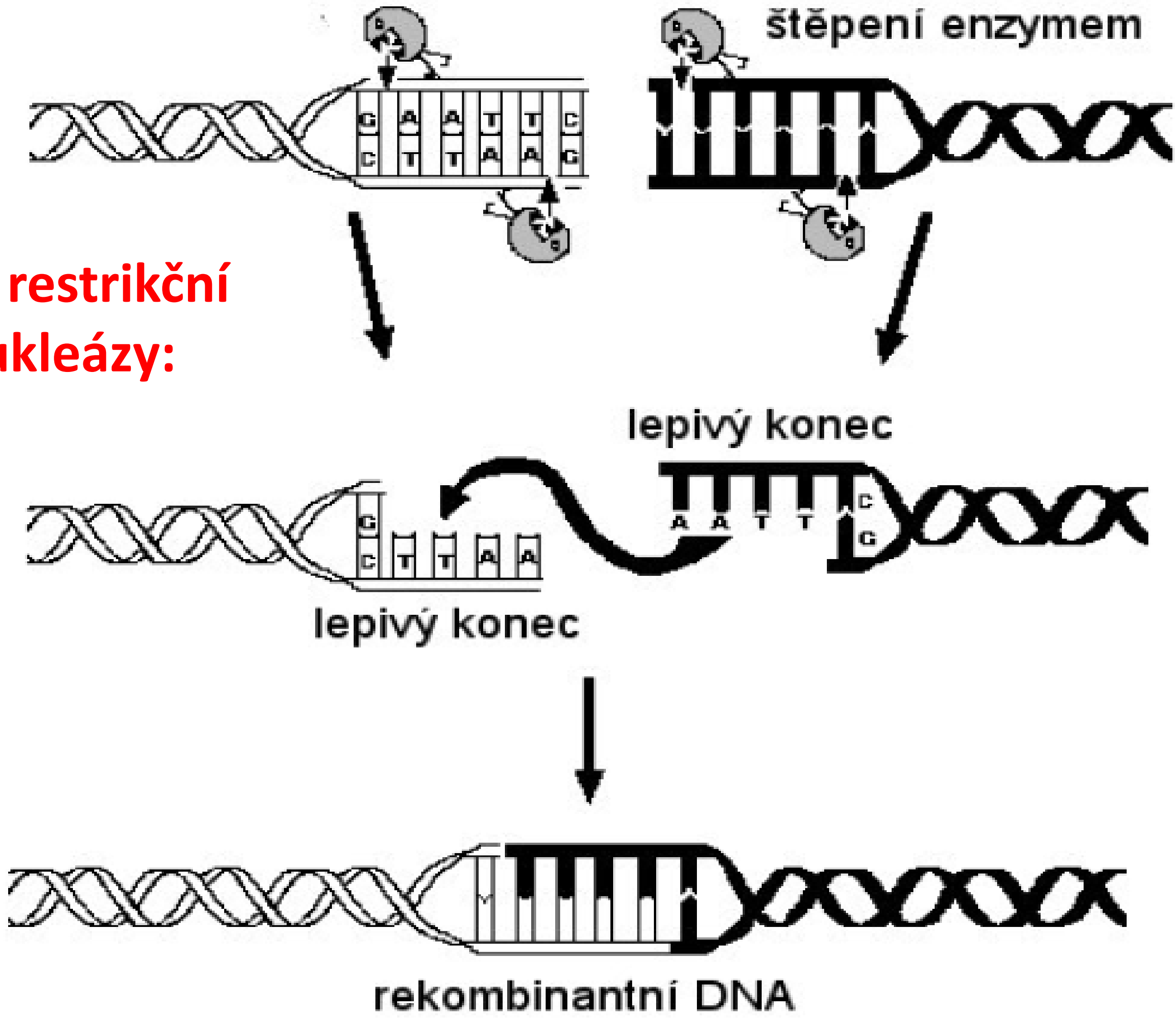
- přepíše jakoukoliv **mRNA do podoby DNA**
- eukaryotickou mRNA (tedy zbavenou intronů = po sestřihu) do podoby **cDNA** – komplementární DNA pro bakteriální buňku
- bakterie dokáže podle tohoto genu vyrábět požadovanou eukaryotní bílkovinu (bakteriální buňka totiž nedokáže introny vyštěpit = nelze tedy vkládat přímo kus DNA, který introny obsahuje!!!)

GENOVÉ INŽENÝRSTVÍ:

- ✓ virus vpraví gen (upravenou DNA) do buňky a začlení ji do hostitelovy výbavy **– proces se nazývá transdukce**, **virová DNA** se nazývá **vektor**
- ✓ Virová DNA nesmí obsahovat geny lytického procesu – hostitelovy buňky se musí co nejdéle množit
- ✓ Infikováním embrya v raném stádiu vývoje = všechny buňky se změní
  - tento jedinec předá gen i do dalších generací (transgenní zvířata)

*****Způsob tvorby a začlenění vektoru = TRANSDUKCE:**

Funkce restrikční endonukleázy:

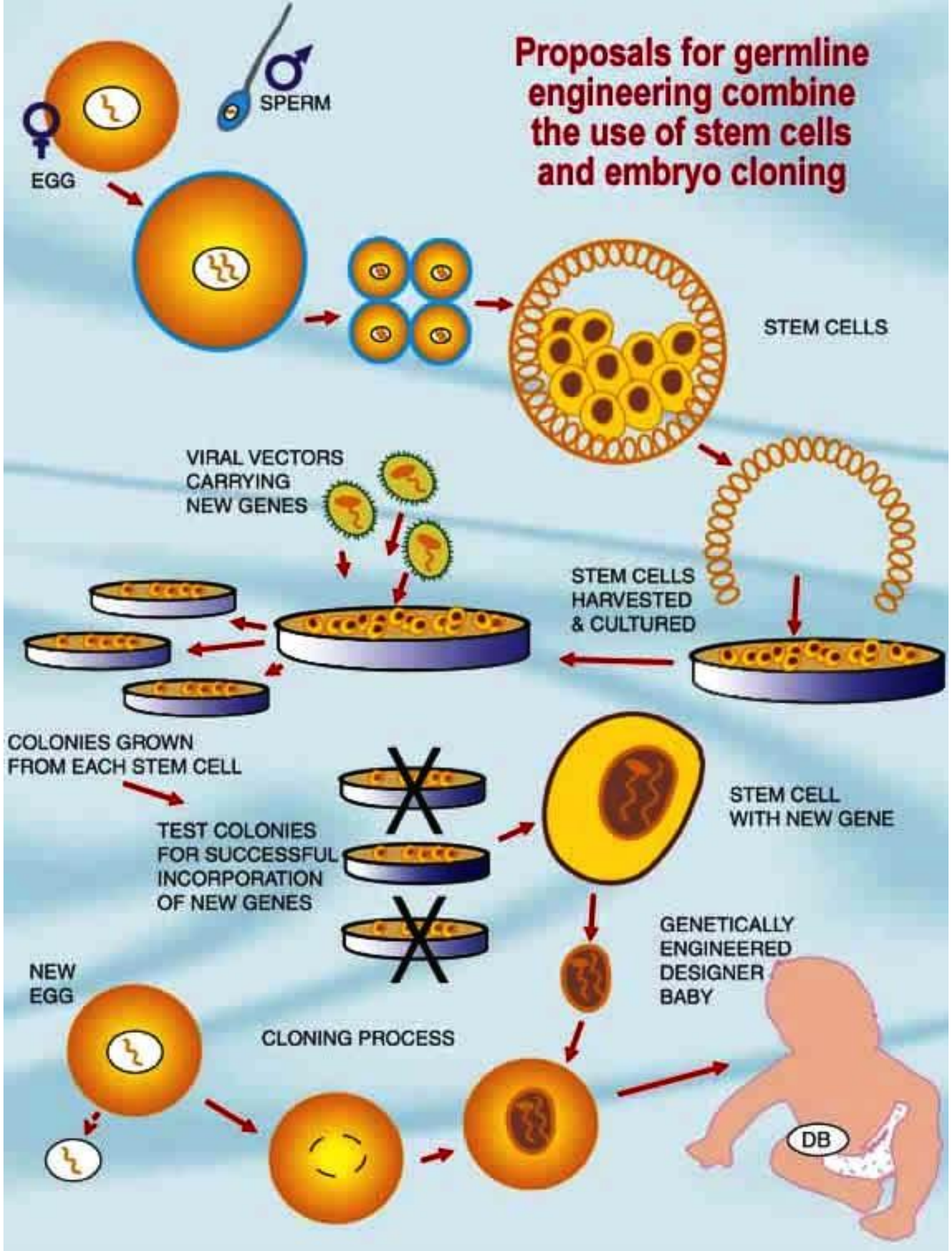


***Restrikční endonukle**ázy** = enzymy

- štěpí cizorodé DNA, které na rozdíl od vlastní DNA nemají chráněné specifické pořadí nukleotidů proti štěpení (metylací nukleotidů = připojením CH_3 na bázi nukleotidu). Chrání tak vlastní DNA
- štěpí DNA dvoušroubovici v místech, kde se pořadí nukleotidů dá u vláken číst stejně v obou směrech (palindrom)
- takto vzniknou tzv. “lepivé konce“, které lze využít ke slepení vkládaného cizorodého vlákna DNA, které musí být štěpeno stejným typem endonukleázy (má tedy stejné konce)
- dnes už dokáží genetici uměle vytvářet jaké-koli lepivé konce ….☺
- původní endonukleázy nazvány podle druhů bakterií, ve kterých byly poprvé nalezeny:
- BsuI (Bacillus subtilis): GGICC
  CCIGG

HindIII : AIAGCTT
T TCGAIA

EcoRI: GIAATT C
C TTAAIG


Proposals for germline engineering combine the use of stem cells and embryo cloning
EGG
SPERM
STEM CELLS
VIRAL VECTORS CARRYING NEW GENES
STEM CELLS HARVESTED & CULTURED
COLONIES GROWN FROM EACH STEM CELL
TEST COLONIES FOR SUCCESSFUL INCORPORATION OF NEW GENES
STEM CELL WITH NEW GENE
GENETICALLY ENGINEERED DESIGNER BABY
NEW EGG
CLONING PROCESS
DB